

明細書

クローン病診断用試薬

発明の技術分野

本発明は、クローン病の診断用試薬ならびにその診断方法に関する。

5

発明の背景

10

自己免疫疾患とは、生体防御機構である免疫系が自己の細胞を攻撃してしまう現象である。自己抗原と反応する抗体やリンパ球が誘導され、その結果組織障害や病変が生じる。自己免疫疾患は、臓器特異性のない疾患と、特異性のある疾患の2つに大別される。自己免疫の関与が示唆されているものの原因が明らかでないものも多く、それらの発症機序を含め、診断方法等、解決すべき課題は多い。

15

自己免疫疾患には、自己抗原に対する免疫反応およびアレルギーが関与していると考えられてはいるが、その原因が明らかにされていない疾患の一つとして、クローン病がある。この疾患は、炎症性腸疾患であり、消化管壁全層にわたって炎症性変化がみられ、非連続性に深い潰瘍が生じ、組織学的には非乾酪性肉芽腫を特徴とする。また、病変部位がスキップするという特徴を呈する。現在、クローン病の確定診断としては、その症状、X線、内視鏡、組織像を総合して行なわれているが、いずれも症状が進行してからの診断となり、より早期の診断が望まれている。さらに、他の炎症性の腸疾患、例えば急性または慢性虫垂炎、腸結核、潰瘍性大腸炎、虚血性腸炎等との鑑別が必要である。

20

一方、サイトカインや接着性分子の発現に注目した分子生物学的なアプローチから、インターロイキン2 (IL-2) 受容体、トランスフェリン受容体、E-セレクトイン (ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) とも称される)、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)、L-セレクトイン、CD11、OX40およびOX40リガンド等の膜蛋白質や、インターロイキン1 β (IL-1 β)、IL-2、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン15 (IL-15)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン18 (IL-18)、インターロイキン8 (IL-8)、MCP-1、ENA-78等のサイトカインやケモカインの遺伝子が、クローン病においてアップレギュレーションされているという報告がある。しかしながら、報告にあるこれらの遺伝子の殆どは、クローン病における炎症に伴う

非特異的な免疫応答によりアップレギュレーションを受けるものであって、クローン病に特異的な現象ではない。

発明の要約

本発明の目的は、クローン病の診断に有用な方法ならびに診断用試薬を提供することにある。

本発明者らは、上記課題に鑑み、クローン病の早期診断、他の疾患との識別を可能とするべく、クローン病における遺伝子レベルでの発現プロファイルを鋭意検討した。クローン病は、病変部と非病変部とが肉眼的に明瞭に区別できる為、同一個体において病変部と非病変部での発現される遺伝子を比較し得るディファレンシャルディスプレイ法 (Liang, P., and Pardee, A.B. Science 257:967-971 (1992)、Liang, P., and Pardee, A.B. Curr. Opin. Immunol. 7:274-280 (1995)) を用いて、病変部と非病変部における発現遺伝子プロファイルを比較した。結果、ある種の遺伝子が病変部で特異的にその発現が増強されていることを見出し、さらに該遺伝子を同定して本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は以下の通りである。

(1) (1) インターロイキン 2 制御型プロテインホスファターゼタイプ 6 (type 6 protein phosphatase regulated by IL-2 ; 以下 I L - 2 制御型 P P 6 ともいう) 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、(2) T r a f 2 ・ N c k 相互作用型キナーゼ (Traf2 and Nck interacting kinase ; 以下 T N I K ともいう) 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、(3) F L I C E 阻害蛋白質 (F L I C E inhibitory protein ; 以下 F L I P ともいう) 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、および (4) グルココルチコイド受容体 α (以下 G R α ともいう) 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも 1 種、あるいは全てを含んでなる、クローン病の診断用試薬。

(2) さらに、(5) チトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、および (6) チトクローム b 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも 1 種を含んでなる、上記 (1) 記載のクローン病の診断用試薬。

(3) 特異的親和性を有する物質が、オリゴまたはポリヌクレオチドプローブ、ある

いはオリゴまたはポリヌクレオチドプライマー対である、上記（１）または（２）記載のクローン病の診断用試薬。

- （４）（１）ＩＬ－２制御型ＰＰ６に対して特異的親和性を有する物質、（２）ＴＮＩＫに対して特異的親和性を有する物質、（３）ＦＬＩＰに対して特異的親和性を有する物質、
5 および（４）ＧＲαに対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも１種、あるいは全てを含んでなる、クローン病の診断用試薬。

（５）さらに、（５）チトクロームオキシダーゼサブユニットＩ に対して特異的親和性を有する物質、および（６）チトクロームｂに対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも１種を含んでなる、上記（４）記載のクローン病の診断用試薬。

（６）特異的親和性を有する物質が、抗体またはその断片である上記（４）または（５）記載のクローン病の診断用試薬。

（７）クローン病を発症しているか、そのおそれのある動物から生体試料を採取する工程、およびＩＬ－２制御型ＰＰ６遺伝子、ＴＮＩＫ遺伝子、ＦＬＩＰ遺伝子、および
15 びＧＲα遺伝子からなる群より選択される少なくとも１種の遺伝子の当該生体試料における発現状況を解析する工程を含むクローン病の診断方法。

（８）さらに、チトクロームオキシダーゼサブユニットＩ 遺伝子およびチトクロームｂ遺伝子からなる群より選択される少なくとも１種の遺伝子の発現状況を解析する工程を含む上記（７）記載のクローン病の診断方法。

- 20 （９）クローン病を発症しているか、そのおそれのある動物から生体試料を採取する工程、およびＩＬ－２制御型ＰＰ６、ＴＮＩＫ、ＦＬＩＰ、およびＧＲαからなる群より選択される少なくとも１種の蛋白質の当該生体試料における発現状況を解析する工程を含むクローン病の診断方法。

（１０）さらに、チトクロームオキシダーゼサブユニットＩ、およびチトクローム
25 ｂからなる群より選択される少なくとも１種の蛋白質の発現状況を解析する工程を含む、上記（９）記載のクローン病の診断方法。

（１１）生体試料が、該動物由来の回腸組織または結腸組織である、上記（７）～（１０）のいずれかに記載のクローン病の診断方法。

発明の詳細な説明

本発明における遺伝子とは、特に断りのない限りいかなる態様のものであってもよい。例えば、mRNAに加えて、mRNAから調製される相補DNA (cDNA) 等が含まれる。

以下、本発明の診断用試薬に含め得る各構成要素について詳細に説明する。

- 5 (1) IL-2 制御型 PP6 (type 6 protein phosphatase regulated by IL-2; Filali, M., et al., J. Cell. Biochem. 73:153-163 (1999)に記載の 36 kDa の蛋白質)

IL-2 制御型 PP6 とは、ヒト PP6 とアミノ酸レベルで 98% の相同性があるリン酸化蛋白質であり、末梢 T 細胞において IL-2 により発現が誘導される。正確な機能は未だ明らかにされていないが、細胞増殖に関与することも示唆されている (Filali, M., et al., (1999) 上述)。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められる IL-2 制御型 PP6 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該遺伝子に特異的親和性を有するオリゴまたはポリヌクレオチドプローブ (以下、便宜上単にプローブともいう)、ならびにオリゴまたはポリヌクレオチドプライマー対 (以下、便宜上単にプライマー対ともいう) が挙げられ、その特異的親和性とは、目的の遺伝子にのみハイブリダイズする性質を意味し、従って当該遺伝子の全部もしくは一部に完全相補的なものか、もしくは上記性質を満たす範囲で 1 乃至数個のミスマッチを含んでいても良い。該プローブ、プライマー対は、当該遺伝子に特異的親和性を有するものであれば特に限定されないが、例えば当該遺伝子の塩基配列の全部もしくは一部、ならびにそれらの相補配列を含むオリゴまたはポリヌクレオチド等が挙げられ、検出すべき遺伝子の形態に応じて適宜選択する。後述するが、本発明の診断用試薬を用いて PCR 等を行なう場合には、配列表配列番号 1 および配列表配列番号 2 に記載の両オリゴヌクレオチドをプライマー対として用いることができる。当該オリゴまたはポリヌクレオチドは当該遺伝子との特異的親和性を有している限りはその由来は特に限定されず、合成されたものであっても、当該遺伝子から必要な部分を切り出し、通常行なわれる方法によって精製されたものであってもよい。これらのオリゴまたはポリヌクレオチドは、蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められる IL-2 制御型 PP6 に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体また

はその断片が挙げられ、その特異的親和性とは抗原・抗体反応により該蛋白質を特異的に認識し、結合する能力のことである。該抗体またはその断片は、当該蛋白質と特異的に結合可能なものであれば特に限定されず、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびそれらの機能的断片のいずれであってもよい。これらの抗体あるいはその機能的断片は、通常当分野で行なわれている方法によって製せられる。例えばポリクローナル抗体を用いる場合であれば、該蛋白質をマウスやウサギといった動物の背部皮下あるいは腹腔内あるいは静脈等に注射して免疫し、抗体価が上昇するのを待った後に抗血清を採取する方法が挙げられ、またモノクローナル抗体を用いる場合であれば、常法に従いハイブリドーマを作製して、その分泌液を採取する方法が挙げられる。抗体断片を製造する方法としてはクローニングした抗体遺伝子断片を微生物等に発現させる方法がよく用いられている。当該抗体、抗体断片等の純度は、当該蛋白質との特異的親和性を保持している限り、特に限定されない。これらの抗体またはその断片は、蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。

さらに、これらは市販されているものを用いても良い。

(2) T N I K (Traf2 and Nck interacting kinase ; Fu, C.A., et al., J. Biol. Chem. 274:30729-30737 (1999)に記載のG C Kファミリーキナーゼ)

T N I KとはT r a f 2とN c kとに相互作用を示すキナーゼであり、J N Kを活性化する分子として最近同定された。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるT N I K遺伝子に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該遺伝子に特異的親和性を有するプローブ、ならびにプライマー対が挙げられる。ここで遺伝子に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、該プローブ、プライマー対は、上記I L - 2制御型P P 6の項で述べた様にして、当該遺伝子の塩基配列を元に適宜設定、修飾することができる。本発明の診断用試薬を用いてP C R等を行なう場合には、配列表配列番号3および配列表配列番号4に記載の両オリゴヌクレオチドをプライマー対として用いることができる。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるT N I Kに対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体またはその断片が挙げられる。ここで蛋白質に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、当該抗体ならびにその機能的断片は上記I L - 2制御型P P 6の項で述べた方法と同様な方法

により調製される。

(3) F L I P (F L I C E inhibitory protein ; Irmeler, M., et al., Nature 388:190-195 (1997)に記載、ヒト F L I P_L : GenBank accession No. U97074、ヒト F L I P_S : GenBank accession No. U97075)

- 5 F L I Pとは、F L I C Eの構造類似体で、F A D DとF L I C Eとの会合を阻害することで、アポトーシスを抑制することが報告されている (Irmeler, M., et al., (1997) 上述、Hu, S., et al., J. Biol. Chem. 272:17255-17257 (1997))。ロングフォーム (F L I P_L) とショートフォーム (F L I P_S) が存在する。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるF L I P遺伝子に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該遺伝子に特異的親和性を有するプローブ、ならびにプライマー対が挙げられる。ここで遺伝子に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、該プローブ、プライマー対は、上記 I L - 2 制御型 P P 6 の項で述べた様にして、当該遺伝子の塩基配列を元に適宜設定、修飾することができる。本発明の診断用試薬を用いて P C R 等を行なう場合には、配列表配列番号 5 および配列表配列番号 6 に記載の両オリゴヌクレオチドを (F L I P_L に対して)、配列表配列番号 7 および配列表配列番号 8 に記載の両オリゴヌクレオチドを (F L I P_S に対して)、それぞれプライマー対として用いることができる。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるF L I Pに対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体またはその断片が挙げられる。ここで蛋白質に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、当該抗体ならびにその機能的断片は上記 I L - 2 制御型 P P 6 の項で述べた方法と同様な方法により調製される。

(4) G R α (グルココルチコイド受容体 α ; Hollenberg, S. M., et al., Nature 318:635-641 (1985) に記載される 9 4 k D a の蛋白質)

- 25 G R α とは、グルココルチコイドをリガンドとする核内受容体スーパーファミリーに属する受容体であり、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を促進する転写制御因子である。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるG R α 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該遺伝子に特異的親和性を有するプローブ、ならび

にプライマー対が挙げられる。ここで遺伝子に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、該プローブ、プライマー対は、上記 I L - 2 制御型 P P 6 の項で述べた様にして、当該遺伝子の塩基配列を元に適宜設定、修飾することができる。本発明の診断用試薬を用いて P C R 等を行なう場合には、配列表配列番号 9 および配列表配列番号 10 に記載の両オリゴヌクレオチドをプライマー対として用いることができる。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められる G R α に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体またはその断片が挙げられる。ここで蛋白質に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、当該抗体ならびにその機能的断片は上記 I L - 2 制御型 P P 6 の項で述べた方法と同様な方法により調製される。

(5) チトクロームオキシダーゼサブユニット I (Sanger, F., et al., J. Mol. Biol. 143(2), 161-178 (1980)、Anderson, S., et al., Nature 290 (5806), 457-465 (1981)に記載される)

チトクロームオキシダーゼは、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系の末端酸化酵素であり、7 ~ 13 個のサブユニットからなり、A D P と無機リンから A T P を合成するのに必須の酵素である。炎症部位で産生される N O は、酸素分子と競合的にチトクロームオキシダーゼサブユニット I に結合することが知られている。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるチトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該遺伝子に特異的親和性を有するプローブ、ならびにプライマー対が挙げられる。ここで遺伝子に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、該プローブ、プライマー対は、上記 I L - 2 制御型 P P 6 の項で述べた様にして、当該遺伝子の塩基配列を元に適宜設定、修飾することができる。本発明の診断用試薬を用いて P C R 等を行なう場合には、配列表配列番号 11 および配列表配列番号 12 に記載の両オリゴヌクレオチドをプライマー対として用いることができる。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるチトクロームオキシダーゼサブユニット I に対して特異的親和性を有する物質としては、例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体またはその断片が挙げられる。ここで蛋白質に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、当該抗体ならびにその機能的断片は上記 I L - 2 制御型 P P

6の項で述べた方法と同様な方法により調製される。

(6)チトクロームb (Anderson, S., et al., Nature 290 (5806), 457-465 (1981)に記載される)

チトクロームとは電子伝達を行なう一群のヘム蛋白質をいい、チトクロームbはc 1
5 やa 3等とともにミトコンドリア内膜に存在し、電子伝達系を構成する。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められる、チトクロームb遺伝子に対して特
異的親和性を有する物質としては、例えば当該遺伝子に特異的親和性を有するプロー
ブ、ならびにプライマー対が挙げられる。ここで遺伝子に特異的親和性を有するとは
上述の通りであり、該プローブ、プライマー対は、上記IL-2制御型PP6の項で
述べた様にして、当該遺伝子の塩基配列を元に適宜設定、修飾することができる。本
10 発明の診断用試薬を用いてPCR等を行なう場合には、配列表配列番号13および配
列表配列番号14に記載の両オリゴヌクレオチドをプライマー対として用いることが
できる。

本発明のクローン病の診断用試薬に含められるチトクロームbに対して特異的親和
15 性を有する物質としては、例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体またはその
断片が挙げられる。ここで蛋白質に特異的親和性を有するとは上述の通りであり、当
該抗体ならびにその機能的断片は上記IL-2制御型PP6の項で述べた方法と同様
な方法により調製される。

本発明のクローン病の診断用試薬に含め得る各構成要素(上記(1)~(6))は1種類
20 を単独で含めることもできるが、好ましくはよりクローン病に特異性の高い上記(1)~
(4)、すなわちIL-2制御型PP6あるいは該遺伝子に対して特異的親和性を有する
物質、TNFあるいは該遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、FLIPある
いは該遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、GR α あるいは該遺伝子に対して
特異的親和性を有する物質のいずれか1種あるいは全部を含むことが好ましい。所望
25 により上記(5)~(6)、すなわちチトクロームオキシダーゼサブユニットIあるいは該
遺伝子に対して特異的親和性を有する物質およびチトクロームbあるいは該遺伝子に
対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも1種を含んで
いても良い。複数の物質を用いる場合には、それらを混合し、1つの試薬として用い
ても良く、また別々の試薬として用いても良い。複数の物質を混合して1つの試薬と

した場合でも、目的蛋白質の分子量の違い、あるいは目的遺伝子の長さの違いに基づいて容易に個々の発現を識別することができる。特に診断対象であるクローン病における遺伝子発現プロファイルに個体差がある場合や、迅速、且つ簡便に測定することが要求される場合には各物質を混合して1つの試薬として用いることが好ましい。また、詳細な今後の治療方針をも含めた診断が要求される場合には各構成要素を別個に含む診断用試薬を用いることが好ましい。

本発明はまた、クローン病の診断方法を提供する。本発明の診断方法は具体的には、上述のクローン病の診断用試薬を用いることで好適に実施することができる。具体的には、まず診断の対象となる動物の生体試料を採取する。本明細書において「動物」とは、ヒトを含めた各種哺乳類ならびに鳥類を意味し、具体的には、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、ウサギ、ニワトリ等が例示される。生体試料としては、上記各種遺伝子または蛋白質の発現に顕著な変化が観察されるものであれば特に限定されないが、具体的には、生体から採取される細胞、組織あるいは尿や血液等が用いられる。好適には当該生体試料は、より顕著な発現増強が確認される、回腸部分ならびに結腸部分の組織であり、より好ましくは結腸部分の組織である。次いで、該試料からmRNAあるいは蛋白質の抽出を行なう。mRNAを抽出した場合には、本発明のプローブを含む診断用試薬を用いてノザンブロット等、当分野で通常行なわれる手法を用いて、その発現状況を調べる。また、本発明のプライマー対を含む診断用試薬を用いてRT-PCR法等を実施することもできる。一方、蛋白質を抽出した場合には、本発明の抗体またはその断片を含む診断用試薬を用いてイムノブロット、ウエスタンブロット等、当分野で通常行なわれる手法を用いて、その発現状況を調べる。

また、診断の対象から採取した組織を用いて組織切片を作製し、本発明のプローブを含む診断用試薬や抗体を含む診断用試薬等を用いて組織染色を行なうことによって、クローン病の病変部位の有無、あるいはその特定が可能である。

上述の如く調べた遺伝子あるいは蛋白質について、高い発現が観察された場合には、該動物はクローン病を発症しているか、もしくはその可能性が極めて高いと判定する。より正確な判定を要する場合には、当該一連のクローン病に特徴的な遺伝子あるいは蛋白質の発現増強がみられないと予想される部位（例えば小腸）と対比することが望

ましい。

本発明においては、上述の本発明の診断用試薬に加え、当該試薬を使用する各種方法に応じて必要な試薬等を併せて梱包し、キットとすることが好ましい。例えば、遺伝子レベルでの発現状況の分析が行なわれる場合には、界面活性剤、蛋白質分解酵素等の生体試料から遺伝子を単離する試薬、緩衝液等も併せてキットとすることができる。蛋白質レベルでの発現状況の分析が行なわれる場合には、例えば生体試料から蛋白質を抽出する試薬、緩衝液等、必要であれば二次抗体や発色試薬等も一緒にしてキット化できる。

また、本発明の診断薬を用い、さらに本発明の診断方法の原理を利用して、クローン病に有用な薬剤のスクリーニング系を構築することができる。

当該スクリーニング系では、薬剤で処理することができ、且つ上述のクローン病特異的な遺伝子あるいは蛋白質の発現の変化を観察することが可能な細胞の集団であればいかなるものも利用することができる。具体的には、対象となる動物由来の組織、ヒト以外の動物（マウス、ウサギ等）、あるいは各種初代培養あるいは樹立株等の細胞等を用いる。当該組織は、標的とする遺伝子が主として発現する部位に応じて適宜選択される。所定の動物由来の組織を採取あるいは準備し、スクリーニングを行なう所定の薬剤で処理後、当該組織における I L - 2 制御型 P P 6 あるいは該遺伝子、T N I K あるいは該遺伝子、F L I P あるいは該遺伝子、G R α あるいは該遺伝子、チトクロームオキシダーゼサブユニット I あるいは該遺伝子およびチトクローム b あるいは該遺伝子のいずれか少なくとも 1 種、あるいは全部の発現状況を調べる。蛋白質レベルでの発現状況、遺伝子レベルでの発現状況をパラレルに測定することも可能であり、それによって当該スクリーニングを実施した薬剤の作用機序を予測することもできる。

以下、本発明を実施例にて具体的且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

実施例 1：病変部位特異的に発現が増強される遺伝子の同定

1. 実験材料・実験方法

クローン病下行結腸切除標本 1 例（社会保険中央総合病院（東京）における外科手術により切除されたもの）の病変部と非病変部をディファレンシャルディスプレイ法

(Delta Differential Display Kit, Clontech, CA) により解析した。両部位での組織からの全RNAの抽出は、TRIZOL reagent (Life Technologies, MD)を用いて添付のマニュアルに従って行なった。1. 5 μ g のオリゴ (dT)₁₅プライマー、1 mM dNTPミックスおよび300単位のMMLV逆転写酵素 (Clontech, CA) を含む終容量15 μ l の反応液中で42℃1時間、続いて75℃で10分間インキュベートして、3 μ g の全RNAから第1 cDNA鎖を合成した。

ディファレンシャルディスプレイ法を実施するためにPCRを行なった。プライマーはアンカーオリゴ (dT)₂₉-mer (Tプライマー) と、非特異的5' オリゴヌクレオチド25-mer (Pプライマー) (共に Clontech) を用いた。10種のPプライマーと9種のTプライマーを適宜組み合わせて、異なる90通りの非特異なPCRプライマー対を用いてcDNAを増幅した。すなわち、0.01または0.0025 μ g の全RNAから合成したcDNAを50 μ M dNTPミックス (Clontech)、1 μ M のPプライマー、1 μ M のTプライマー、および Advantage KlenTaq Polymerase ミックス (50X) (Clontech) を含む終容量10 μ l の反応液中、以下の反応条件でPCR増幅した (サーマルサイクラーMP, タカラ)。

(条件)

最初の3サイクルは低ストリンジェンシー条件下で行なった；

94℃、5分→40℃、5分→68℃、5分 (1サイクル)

94℃、30秒→40℃、30秒→68℃、5分 (2サイクル)。

次いで得られた産物について、残りのサイクルを高ストリンジェンシー条件下で行なった；

94℃、20秒→60℃、30秒→68℃、1分 (30サイクル)。

増幅したcDNAを6%変性スタンダードシーケンシングポリアクリルアミドゲル (Roche Molecular Biochemicals-Boehringer, Mannheim) を用いて断片サイズに応じて分離し、銀染色 (Promega, WI) によって可視化した。

2. 結果

銀染色により、非病変部位と病変部位とのパターンに明らかな違いが観察された。

3. 病変部位特異的に発現増強される遺伝子の同定

銀染色により観察された病変部位で強く検出されたバンドを切り出しDNAを抽出

し、同じプライマーを用いて再び増幅した。切り出したバンドには同サイズの異なる複数の遺伝子断片が含まれているので、増幅した断片をSSCP法 (Hatta, Y, et al., Immunogenetics 49:280-286 (1999)) により選別した。

再増幅したPCR産物をpCR-TOPOベクター (TOPO TA cloning kit, Invitrogen, Netherlands) にクローニングし、dye-terminator 法 (ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing-Ready Reaction Kit) に準じ、マニュアルに従って fluorescence-based automated cycle sequencing (ABI310, Applied Biosystems, Foster city, CA) に付し、シークエンシングを行なった。得られたデータをもとにEMBL/GenBankデータベース、NCBI BLASTプログラム (National Library of Medicine, Bethesda, MD) を用いてホモロジー検索を行なった。

結果、クローン病腸組織において新たにIL-2制御型PP6 mRNA、TNIK mRNA、FLIP mRNA、GR α mRNA、チトクロームオキシダーゼサブユニットI mRNA、およびチトクロームb mRNAの発現の増強が確認された。

実施例2：半定量的RT-PCR

1. 実験材料・実験方法

クローン病下行結腸切除標本6例 (社会保険中央総合病院 (東京) における外科手術により切除されたもの) の病変部と非病変部から、TRIZOL reagent (Life Technologies, MD) を用い、添付のマニュアルに従って全RNAを抽出した。1.5 μ g のオリゴ (dT)₁₅ プライマー、1 mM dNTP ミックスおよび300単位のMMLV逆転写酵素 (Clontech, CA) を含む終容量15 μ l の反応液中で42℃1時間、続いて75℃で10分間インキュベートを行なって、3 μ g の全RNAから第1 cDNA鎖を合成した。

得られた第1 cDNA鎖を鋳型にして半定量的RT-PCRを行なった。対照としてはGAPDH mRNAを用いた。表1に示す各プライマー対、GeneAmp reagents および AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) を用いてPCR増幅を行なった (サーマルサイクラーMP, タカラ)。

表 1

抑制型	染色体位置	PCR 産物のサイズ	プライマー (センス)	プライマー (アンチセンス)	アニリング温度
IL-2 抑制型 PP6	未同定	413	ACCGATTTTCTGCGCTCTT (配列表配列番号 1)	TCGTGCCCACTGAATAACAA (配列表配列番号 2)	50°C
TNIK	未同定	184	TGGTTCACACACTGGTTTCG (配列表配列番号 3)	CCGGCCATAGGTGTTTACAT (配列表配列番号 4)	50°C
FLIP _L	2q33-34	204	CTCCAAGCAGCAATCCAAA (配列表配列番号 5)	GATTCCTAGGGCTTGCTCT (配列表配列番号 6)	50°C
FLIP _S	2q33-34	203	TGCCTAAAGAAGATCCACAGAA (配列表配列番号 7)	CACATGGAACAATTTCCAAGAA (配列表配列番号 8)	50°C
GR α	5q31	477	CCTAAGGACGGTCTCAAGAGC (配列表配列番号 9)	GCCAAAGTCTGGCCCTCTAT (配列表配列番号 10)	57°C
チトクローム b サブユニット I	ミトコンドリア	201	ACGCACTCTCCCTGAACT (配列表配列番号 11)	GGGGAATGCTGGAGATTGTA (配列表配列番号 12)	50°C
チトクローム b	ミトコンドリア	195	CACATCAAGCCGAATGATA (配列表配列番号 13)	GTCGCGGCTAGGAGTCAAT (配列表配列番号 14)	50°C

PCR条件

94℃、10分間

94℃、30秒→アニーリング（30秒、温度は表1参照）→72℃、30分（30サイクル）

5 72℃、10分間

得られたPCR産物をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行ない分離し、SYBR Gold (Eugene OR)で染色した。走査型デンストメーター (Molecular Imager FX, BIO-RAD, Hercules, CA) を用いてPCR産物を定量した。

クローン病下行結腸切除標本6例 (No. 1～No. 6) の病変部と非病変部とにおける各遺伝子の発現状況を調べた。結果をmRNA比として表2に示す。

表2

	標本1		標本2		標本3		標本4		標本5		標本6	
	炎症部 (C) / 非炎症部 (C)	炎症部 (I) / 非炎症部 (I)	炎症部 (C) / 非炎症部 (C)	炎症部 (I) / 非炎症部 (I)	炎症部 (C) / 非炎症部 (C)	炎症部 (I) / 非炎症部 (I)	炎症部 (C) / 非炎症部 (C)	炎症部 (I) / 非炎症部 (I)	炎症部 (TI) / 非炎症部 (TI)	炎症部 (C) / 非炎症部 (C)	炎症部 (C) / 非炎症部 (C)	炎症部 (C) / 非炎症部 (C)
GR α	4/1	1.5/1	4/1	1/1	4/1	1/1	4/1	1/1	4/1	4/1	4/1	4/1
チトクロームb	2/1	1/1	8/1	1/1	8/1	1/1	8/1	1/1	2/1	6/1	6/1	6/1
チトクロームc β	1.7/1	1/1	8/1	1/1	8/1	1/1.5	8/1	1/1.5	2/1	8/1	8/1	8/1
アエツトI												
IL-2制御型	3/1	2.7/1	8/1	2.7/1	8/1	2.7/1	8/1	2.7/1	1.7/1	3/1	3/1	3/1
PP6												
FLIP _S	12/1	1/1	8/1	1/1	8/1	1/1	8/1	1/1	3/1	2/1	2/1	2/1
FLIP _L	10/1	2/1	8/1	2/1	8/1	1/1	8/1	1/1	3/1	16/1	16/1	16/1
TNIK	4/1	1/1	5/1	1/1	5/1	1/1	5/1	1/1	2/1	13/1	13/1	13/1

C : 結腸部、I : 回腸部、TI : 回腸末端部

病変部での I L - 2 制御型 P P 6 遺伝子、T N I K 遺伝子、F L I P 遺伝子、G R α 遺伝子、チトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子、およびチトクローム b 遺伝子の発現の増強が確認された。さらに結腸部で特にその差が顕著であった。

実施例 3 : 免疫組織染色

5 1. 実験材料・方法

クローン病下行結腸切除標本 1 例 (社会保険中央総合病院 (東京) における外科手術により切除されたもの) の病変部と非病変部の組織を 5 0 % O C T (Tissue-Tek, Sakura Finetech, Torrance, CA) / P B S 中につけ、液体窒素で瞬時に凍結させ、使用時まで - 7 0 $^{\circ}$ C で保存した。該凍結試料から連続切片 (厚さ : 5 μ m) を作製し、スライドガラス上で風乾し、アセトン中で 2 0 分間固定した。該切片を 5 % 過酸化水素含有 P B S でプレインキュベーションして、次いで 1 次抗体と 4 5 分間インキュベートした。抗体には、ヒト F L I P_L の 2 0 1 - 3 5 0 アミノ酸に相当するエピトープに対するウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz, CA) を、P B S で 5 0 倍希釈したものを用いた。1 次抗体との反応後、P B S で 3 回洗浄し、次いでペルオキシダーゼ標識されたヤギ抗ウサギ I g G 抗体 (ニチレイ) で 3 0 分間インキュベートし、次いで発色試薬 (Histofine simplestain P O [R] , ニチレイ) とインキュベートし、発色させた。

2. 結果

病変部位で F L I P_L の発現が増強されていることが確認された。

本発明では、病変部位に特異的に発現増強される遺伝子に注目してその挙動を調べることにより、より簡便にまた、迅速にクローン病の診断が可能となる。さらに当該疾患に係わる注目すべき遺伝子を見出したことによりクローン病に有用な薬剤のスクリーニングにも利用できる。

本出願は、日本で出願された特願 2 0 0 0 - 1 6 2 8 5 8 号を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

配列表フリーテキスト

配列番号1 : IL-2制御型PP6 mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号2 : IL-2制御型PP6 mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号3 : TNF mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号4 : TNF mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号5 : FLIP_L mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号6 : FLIP_L mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号7 : FLIP_S mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号8 : FLIP_S mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号9 : GR α mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号10 : GR α mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号11 : チトクロームオキシダーゼサブユニットI mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号12 : チトクロームオキシダーゼサブユニットI mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号13 : チトクロームb mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号14 : チトクロームb mRNAのRT-PCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

特許請求の範囲

1. (1) インターロイキン2制御型プロテインホスファターゼタイプ6遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、(2) T r a f 2・N c k相互作用型キナーゼ遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、(3) F L I C E阻害蛋白質遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、および(4) グルココルチコイド受容体 α 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも1種を含んでなる、クローン病の診断用試薬。
5
2. (1) インターロイキン2制御型プロテインホスファターゼタイプ6遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、(2) T r a f 2・N c k相互作用型キナーゼ遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、(3) F L I C E阻害蛋白質遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、および(4) グルココルチコイド受容体 α 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質を含んでなる請求項1記載のクローン病の診断用試薬。
10
3. さらに、(5) チトクロームオキシダーゼサブユニットI 遺伝子に対して特異的親和性を有する物質、および(6) チトクロームb遺伝子に対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも1種を含んでなる、請求項1または2記載のクローン病の診断用試薬。
15
4. 特異的親和性を有する物質が、オリゴまたはポリヌクレオチドプローブである、請求項1～3のいずれかに記載のクローン病の診断用試薬。
5. 特異的親和性を有する物質が、オリゴまたはポリヌクレオチドプライマー対である、請求項1～3のいずれかに記載のクローン病の診断用試薬。
20
6. (1) インターロイキン2制御型プロテインホスファターゼタイプ6に対して特異的親和性を有する物質、(2) T r a f 2・N c k相互作用型キナーゼに対して特異的親和性を有する物質、(3) F L I C E阻害蛋白質に対して特異的親和性を有する物質、および(4) グルココルチコイド受容体 α に対して特異的親和性を有する物質からなる群より
25 選択される少なくとも1種を含んでなる、クローン病の診断用試薬。
7. (1) インターロイキン2制御型プロテインホスファターゼタイプ6に対して特異的親和性を有する物質、(2) T r a f 2・N c k相互作用型キナーゼに対して特異的親和性を有する物質、(3) F L I C E阻害蛋白質に対して特異的親和性を有する物質、および(4) グルココルチコイド受容体 α に対して特異的親和性を有する物質を含んでなる請

求項6記載のクローン病の診断用試薬。

8. さらに、(5)チトクロームオキシダーゼサブユニットI に対して特異的親和性を有する物質、および(6)チトクロームbに対して特異的親和性を有する物質からなる群より選択される少なくとも1種を含んでなる、請求項6または7記載のクローン病の

5 診断用試薬。

9. 特異的親和性を有する物質が、抗体またはその断片である請求項6～8のいずれかに記載のクローン病の診断用試薬。

10. クローン病を発症しているか、そのおそれのある動物から生体試料を採取する工程、およびインターロイキン2制御型プロテインホスファターゼタイプ6遺伝子、
10 T r a f 2・N c k相互作用型キナーゼ遺伝子、F L I C E阻害蛋白質遺伝子、およびグルココルチコイド受容体 α 遺伝子からなる群より選択される少なくとも1種の遺伝子の当該生体試料における発現状況を解析する工程を含むクローン病の診断方法。

11. さらに、チトクロームオキシダーゼサブユニットI 遺伝子、およびチトクロームb 遺伝子からなる群より選択される少なくとも1種の遺伝子の発現状況を解析する
15 工程を含む、請求項10記載のクローン病の診断方法。

12. クローン病を発症しているか、そのおそれのある動物から生体試料を採取する工程、およびインターロイキン2制御型プロテインホスファターゼタイプ6、T r a f 2・N c k相互作用型キナーゼ、F L I C E阻害蛋白質、およびグルココルチコイド受容体 α からなる群より選択される少なくとも1種の蛋白質の当該生体試料における
20 発現状況を解析する工程を含むクローン病の診断方法。

13. さらに、チトクロームオキシダーゼサブユニットI 、およびチトクロームb からなる群より選択される少なくとも1種の蛋白質の発現状況を解析する工程を含む、
請求項12記載のクローン病の診断方法。

14. 生体試料が、該動物由来の回腸組織または結腸組織である請求項10～13の
25 いずれかに記載のクローン病の診断方法。

要約書

本発明は、IL-2制御型PP6（または遺伝子）に対して特異的親和性を有する物質、TNIK（または遺伝子）に対して特異的親和性を有する物質、FLIP（または遺伝子）に対して特異的親和性を有する物質、GR α （または遺伝子）に対して

5 特異的親和性を有する物質等からなる、病変部位に特異的に発現増強される蛋白質（または遺伝子）に対して特異的親和性を有する物質群の少なくとも1種を含む、クローン病の診断用試薬を提供し、当該診断用試薬を用いて病変部位に特異的に発現増強される遺伝子に注目してその挙動を調べることにより、より簡便にまた、迅速に当該疾患の診断が可能となる。

United States Patent & Trademark Office
Office of Initial Patent Examination

Application papers not suitable for publication

SN 09725752 Mail Date 11.30.00

- ☒ Non-English Specification
- ☐ Specification contains drawing(s) on page(s) _____ or table(s) _____
- ☐ Landscape orientation of text ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ Handwritten ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ More than one column ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ Improper line spacing ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ Claims not on separate page(s)
- ☐ Abstract not on separate page(s)
- ☐ Improper paper size -- Must be either A4 (21 cm x 29.7 cm) or 8-1/2"x 11"
- ☐ Specification page(s) _____ ☐ Abstract
- ☐ Drawing page(s) _____ ☐ Claim(s)
- ☐ Improper margins
- ☐ Specification page(s) _____ ☐ Abstract
- ☐ Drawing page(s) _____ ☐ Claim(s)
- ☐ Not reproducible Section
- Reason ☐ Specification page(s) _____
- ☐ Paper too thin ☐ Drawing page(s) _____
- ☐ Glossy pages ☐ Abstract
- ☐ Non-white background ☐ Claim(s)
- ☐ Drawing objection(s)
- ☐ Missing lead lines, drawing(s) _____
- ☐ Line quality is too light, drawing(s) _____
- ☐ More than 1 drawing and not numbered correctly
- ☐ Non-English text, drawing(s) _____
- ☐ Excessive text, drawing(s) _____
- ☐ Photographs capable of illustration, drawing(s) _____